

## حفظ چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی به واسطه انتخاب متعادل

حلیمه رضایی<sup>۱</sup>، زهرا فاضلی عطار<sup>۱،\*</sup>، مرجان مجتوبی نائینی<sup>۱</sup> و صادق ولیان بروجنی<sup>۱\*</sup>  
<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
<sup>۲</sup> گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

ژن *GJB2* کانکسین ۲۶ را که یک پروتئین رابط بین سلولی مهم در پوست است، کد می‌کند. کانکسین ۲۶ یک پروتئین سرتاسری غشاء است که در مسیر بازسازی یون پتاسیم در گوش داخلی نقش دارد. در این مطالعه، آزمون‌های خنثی (neutrality) بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S141 و D13S175 واقع در ناحیه ژن *GJB2* اجرا شد. مجموعه برنامه‌های کامپیوتری آنالیز ژنتیک جمعیت، PyPop و Ppogene32، برای آنالیز اطلاعات به دست آمده از جمعیت ایرانی استفاده شد. ارزش Fnd سه نشانگر SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰، ۱/۰۱۵۵ و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی‌دار P تخمین زده شد که بیانگر تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای چندشکلی در ژن *GJB2* است. در جمعیت مطالعه شده، ارزش F هر سه نشانگر چندشکلی در داخل ناحیه L95 و U95 ارزش F مورد انتظار واقع شده است که نشان‌دهنده عدم تأثیر ناکارآمدی (hitchhiking) ژنتیکی بر روی نشانگرهای ناحیه ژنی *GJB2* است. نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر آن است که چندشکلی این سه نشانگر در ژن *GJB2* به واسطه ارزش سازگاری بالاتر هتروزیگوت‌ها در جمعیت ایرانی حفظ شده است.

**واژه‌های کلیدی:** آزمون neutrality، انتخاب متعادل، جمعیت ایرانی، ژن *GJB2*

### مقدمه

در مطالعه‌ای که به تازگی بر روی جمعیت ناشنوایان ایرانی صورت گرفته است، شیوع آلل‌های جهش یافته ژن *GJB2* در بیماران مبتلا به ناشنوایی در ایران ۱۹/۹ درصد گزارش شده است. به نظر می‌رسد که جهش‌های ژن *GJB2* در جمعیت ناشنوای ایرانی همانند

بسیاری از جمعیت‌های دنیا شیوع بالایی دارد (Daneshi et al., 2011). ژن پروتئین اتصالات شکاف بتا-۲ (*GJB2*) شایع‌ترین ژن عامل بروز فقدان شنوایی توارثی غیرسندرومی در گروه‌های قومی مختلف است (Zelante et al., 1997؛ Estivill et al., 1998؛ Kelley et al., 1998). کانال‌های اتصال شکاف،

*CFTR* دارند. جهش‌های ژن *CFTR* می‌تواند تهاجم سالمونلا تیفی (*Salmonella*) را به سلول‌های اپی‌تلیال محدود کند و باعث حفاظت در برابر تب تیفوئید گردد (Pier et al., 1998؛ Adamo et al., 2009).

در این بررسی، آزمون‌های *neutrality* بر روی اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده از مطالعه جمعیت ایرانی برای سه نشانگر چندشکلی SNP1245، D13S175 و D13S141 که در ناحیه ژنی *GJB2* قرار دارند، اجرا شد. نتایج این مطالعه می‌تواند درک ما را از نقش انتخاب بر روی ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی افزایش دهد.

### مواد و روش‌ها

**نمونه خون:** این مطالعه بر روی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند سالم از افراد مراجعه کننده به مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان انجام شد. این افراد به صورت تصادفی ساده از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، اهواز، تهران، تبریز و یزد انتخاب شدند که به عنوان نمونه‌ای از جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار گرفتند. از هر فرد، ۱۰ میلی‌لیتر خون بر روی محلول EDTA جمع‌آوری شد.

**تعیین ژنوتیپ:** ژنوتیپ نشانگرهای SNP1245، D13S175 و D13S141 بر روی نمونه DNA ژنومی افراد مطالعه شده با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲ درصد تفکیک شدند سپس اندازه قطعات با مقایسه با نشانگرهای اندازه تعیین شدند. توالی پرایمرها و شرایط واکنش PCR در منبع Rezaei و Vallian (۲۰۱۱) توضیح داده شده است.

سیتوپلاسم سلول‌های مجاور را به هم متصل می‌کند و امکان انتشار یون‌ها و متابولیت‌های کوچک را فراهم می‌سازد (Bruzzone et al., 1996؛ Martinez et al., 2009). مشخص شده است که پروتئین GJB2 اتصالات شکاف بین سلول‌های بافت اپی‌تلیال و پیوندی در حلزون گوش را تشکیل می‌دهد و در بازسازی یون‌های پتاسیم درون لنف، مؤثر در فرآیند انتقال صدا، نقش دارد (Kikuchi et al., 1995).

مشخص شده است که افراد هموزیگوت و هتروزیگوت برای جهش شایع ژن *GJB2* در آفریقا، R143W، پوست برون‌ی ضخیم‌تر و ترشح بیشتری از کلرید و سدیم در عرق نسبت به سایر افراد سالم خانواده دارند. این مشاهدات پیشنهاد کننده آن است که فنوتیپ‌های پوست بیرونی که همراه با جهش‌های ژن *GJB2* است، ممکن است مکانیسم حفاظتی در برابر تهاجم پاتوژن‌ها را فراهم سازد (Meyer et al., 2002). بررسی جهش‌های M34T، W44C و R143W در ژن *GJB2* آشکار ساخته است که جهش‌های ژن *GJB2* می‌تواند بقا سلول را در برابر عوامل عفونی افزایش دهد (Common et al., 2004). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سلول‌های بیان کننده جهش R143W در مقایسه با سلول‌های وحشی، حساسیت کمتری نسبت به تهاجم سلولی پاتوژن *Shigella flexneri* دارند (Man et al., 2007). نتایج بررسی‌های متعدد باز شدن کانکسین ۲۶ توسط باکتری شیگلا (*Shigella*) را تأیید می‌کند که ممکن است در پیشرفت تهاجم باکتریایی نقش داشته باشد (Tran et al., 2003). به نظر می‌رسد که حاملین جهش‌های ژن *GJB2* مزیت هتروزیگوتی مشابه با مزیت هتروزیگوسیستی حاملین جهش‌های ژن

محاسبه گردید و ارزش *F<sub>nd</sub>* هم برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی به ترتیب ۰/۵۹۸۰، -۱/۰۱۵۵ و ۰/۶۴۵۷- ولی بدون ارزش معنی دار *P* تخمین زده شد (جدول ۲). نتایج حاصل از اجرا آزمون‌های neutrality بر روی سه نشانگر مطالعه شده در این تحقیق بیانگر آن است که احتمالاً این سه نشانگر در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

جدول ۱- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه Popgene32. *K*=تعداد آلل‌ها، *F*= هموزیگوسیتی مشاهده شده، *L*95= حد پایین اطمینان ۹۵ درصد، *U*95= حد بالای اطمینان ۹۵ درصد.

جایگاه ژنی	k	F	L95	U95
SNP1245	۲	۰/۷۳۱۲	۰/۵۰۲۴	۰/۹۹۰۱
D13S141	۴	۰/۴۲۲۰	۰/۳۲۰۴	۰/۹۴۱۳
D13S175	۷	۰/۳۲۵۵	۰/۲۲۰۴	۰/۷۷۰۸

جدول ۲- تخمین مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده، هموزیگوسیتی مورد انتظار و انحراف نرمال هموزیگوسیتی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 در جمعیت ایرانی با استفاده از برنامه PyPop. *F<sub>nd</sub>*= انحراف نرمال هموزیگوسیتی، *F*= هموزیگوسیتی مشاهده شده، *F<sup>^</sup>*= هموزیگوسیتی مورد انتظار.

جایگاه ژنی	F	F <sup>^</sup>	F <sub>nd</sub>	P
SNP1245	۰/۷۳۱۲	۰/۸۳۱۴	-۰/۵۹۸۰	۰/۲۸۴۲
D13S141	۰/۴۲۲۰	۰/۶۱۰۲	-۱/۰۱۵۵	۰/۱۷۰۵
D13S175	۰/۳۲۵۵	۰/۴۲۲۹	-۰/۶۴۵۷	۰/۳۰۹۶

### بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اصفهان صورت گرفته است، مشخص شده است که هاپلو تیپ‌های نشانگرهای *BgIII-EcoRI* در ژن فنیل آلانین

**تحلیل آماری نتایج:** اطلاعات ژنوتیپی افراد سالم برای تهیه فایل ورودی در دو نرم‌افزار Popgene32 و PyPop برای مطالعه جمعیتی استفاده شد. ارزش هموزیگوسیتی مشاهده شده (*F*)، حد پایین اطمینان ۹۵ درصد (*L*95) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد (*U*95)، ارزش هموزیگوسیتی مورد انتظار (*F<sup>^</sup>*) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی (*F<sub>nd</sub>*) برای هر کدام از نشانگرها به طور جداگانه با استفاده از برنامه‌های Popgene32 نسخه ۱/۳۱ (www.ualberta.ca) و PyPop (Lancaster *et al.*, 2003) تخمین زده شدند.

### مشاهدات

تکثیر ناحیه مربوط به نشانگر SNP1245 قطعه‌ای با طول ۲۸۹ جفت باز تولید کرد. در صورتی که نوکلئوتید T در موقعیت ۱۲۴۵ وجود داشته باشد، هضم آنزیمی با آنزیم *BanI* تولید باندهای ۲۴۵ و ۴۴ جفت باز را می‌کند. نوکلئوتید C در موقعیت ۱۲۴۵ یک جایگاه اضافی برای هضم آنزیمی با آنزیم *BanI* را ایجاد کرد و در نتیجه سه باند ۱۴۸، ۹۷ و ۴۴ جفت باز را تولید می‌کند. برای نشانگرهای D13S141 و D13S175 به ترتیب ۴ و ۷ آلل مختلف در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. آزمون neutrality با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی برای نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 واقع در ناحیه ژنی *GJB2* اجرا شد. نتایج به دست آمده با برنامه Popgene32 و PyPop به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. ارزش *F* برای هر سه نشانگر مطالعه شده در حدواسط *L*95 و *U*95 قرار داشت (جدول ۱). ارزش *F* برای هر سه نشانگر مورد مطالعه کوچکتر از ارزش *F<sup>^</sup>*

مشاهده می‌شود، ارزش  $F$  محاسبه شده برای نشانگرهای مطالعه شده در این تحقیق کوچکتر از ارزش  $F^A$  است و ارزش  $F_{nd}$  نیز منفی است. در صورتی که  $F > F^A$  باشد و ارزش  $F_{nd}$  نیز عددی مثبت باشد، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر یا جایگاه ژنی مورد مطالعه تحت تأثیر انتخاب جهت‌دار قرار دارد. ارزش  $F_{nd}$  منفی و  $F < F^A$  بیانگر آن است که نشانگر یا جایگاه ژنی مطالعه شده در جمعیت تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارد. نتایج آزمون neutrality سه نشانگر چندشکلی ژن  $GJB2$  که با نرم‌افزار Pypop به دست آمده است، اشاره بر آن دارد که نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق در جمعیت ایرانی تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند.

موانع جمعیتی، فرآیندهای تکاملی هستند که مانع تولید مثل درصد بالایی از جمعیت می‌گردند. موانع جمعیتی می‌تواند باعث افزایش درون زادآوری یا اثر بنیان‌گذار گردد که معمولاً باعث کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده نشانگر  $D13S175$  در جمعیت مورد مطالعه ۵۳ درصد برآورد شده است. از میان ۷ آلل مشاهده شده برای نشانگر  $D13S175$  در جمعیت ایرانی آلل ۳ بالاترین فراوانی را نشان می‌دهد و فراوانی تقریباً برابر با ۰/۵ دارد. از میان ۵۳ درصد افراد هتروزیگوت مشاهده شده، ۴۲ درصد افراد مورد مطالعه برای آلل ۳ هتروزیگوت بودند. به نظر می‌رسد، ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر  $D13S175$  در جمعیت ایرانی، سازگاری زیستی و تولید مثلی بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به افراد می‌دهد. نتایج حاصل از اجرای آزمون neutrality بر روی نشانگر  $D13S175$  (جدول ۲) نیز تأییدکننده اثر انتخاب متعادل بر روی این نشانگر است. در مورد نشانگر  $D13S141$ ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت

هیدروکسیلاز ( $PAH$ ) در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند (Fazeli and Vallian, 2010). پس از آن، به منظور افزایش آگاهی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی، اثر انتخاب بر روی سه نشانگر واقع در ناحیه ژنی  $GJB2$  بررسی شد. نشانگرهای  $SNP1245$ ،  $D13S141$  و  $D13S175$  به ترتیب در ناحیه پروموتوری، انتهای سانترومری و تلومری ژن  $GJB2$  قرار دارند.

با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند، ارزش  $F$  (هموزیگوسیتی مشاهده شده) هر سه نشانگر  $SNP1245$ ،  $D13S175$  و  $D13S141$  محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ارزش  $F$  محاسبه شده در حد پایین اطمینان ۹۵ درصد ( $L95$ ) و حد بالای اطمینان ۹۵ درصد ( $U95$ ) ارزش  $F$  مورد انتظار قرار داشت. در صورتی که ارزش  $F$  خارج از مقدار حدواسط  $L95$  و  $U95$  قرار داشته باشد، نشانگر مورد بررسی تحت hitchhiking ژنتیکی قرار خواهد داشت و نیروی انتخاب مؤثر بر روی نشانگر یا جایگاه ژنی دیگر بر روی فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی نشانگر مورد مطالعه تأثیر خواهد گذاشت. بر اساس نتایج به دست آمده از برآورد ارزش  $F$  نشانگرهای مطالعه شده با نرم‌افزار Popgene32، به نظر نمی‌رسد که این سه نشانگر چندشکلی در جمعیت ایرانی تحت تأثیر hitchhiking ژنتیکی قرار داشته باشند.

مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده ( $F$ )، هموزیگوسیتی مورد انتظار ( $F^A$ ) و انحراف نرمال هموزیگوسیتی ( $F_{nd}$ ) سه نشانگر  $SNP1245$ ،  $D13S141$  و  $D13S175$  در جمعیت ایرانی با نرم‌افزار Pypop تخمین زده شد. همان‌طور که در جدول ۲

تقریباً ۲۴ درصد برآورد می‌شود، نتایج آزمون neutrality نشانگر SNP1245 بیانگر آن است که افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ C/T در جمعیت ایرانی سازگاری زیستی بالاتری نسبت به افراد هموزیگوت دارند.

نتایج به دست آمده در این پژوهش، حاکی از تأثیر انتخاب متعادل بر روی نشانگرهای SNP1245، D13S141 و D13S175 ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی است. به نظر می‌رسد که چندشکلی نشانگرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایرانی توسط انتخاب متعادل حفظ می‌شود.

ایرانی به میزان ۶۰ درصد برآورد شده است. آلل ۲ در مقایسه با سایر آلل‌های مشاهده شده برای نشانگر D13S141 فراوانی بالای ۰/۵ نشان می‌دهد که ۵۶ درصد افراد مطالعه شده برای آلل ۲ هتروزیگوت هستند. به نظر می‌رسد که هتروزیگوت بودن برای آلل ۲ نشانگر D13S141 نیز همانند ژنوتیپ هتروزیگوت برای آلل ۳ نشانگر D13S175 مزیت زیستی بالاتری را به افراد اعطا می‌کند. این نتایج با نتایج آزمون neutrality نشانگر D13S141 همخوانی دارد (جدول ۲).

اگر چه هتروزیگوسیته مشاهده شده برای نشانگر SNP1245 در جمعیت ایرانی مورد مطالعه بسیار پایین و

## منابع

- Adamo, P. D., Guerci, V. I., Fabretto, A., Faletra, F., Grasso, D. L., Ronfani, L., Montico, M. and Morgutti, M. (2009) Does epidermal thickening explain *GJB2* high carrier frequency and heterozygote advantage?. *European Journal of Human Genetics* 17: 284-286.
- Bruzzone, R., White, T. and Paul, D. (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal Biochemistry* 238: 1-27.
- Common, J. E., Davies, D. and Kelsell, D. P. (2004) Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. *Journal of Medical Genetics* 41: 573-575.
- Daneshi, A., Hassanzadeh, S., Emamdjomeh, H., Mohammadi, SH., Arzhang, S., Farhadi, M. and Najmabadi, H. (2011) Prevalence of *GJB2*-associated deafness and outcomes of cochlear implantation in Iran. *Journal of Laryngology and Otology* 31: 1-5.
- Estivill, X., Fortina, P. and Surrey, S. (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351: 394-398.
- Fazeli, Z. and Vallian, S. (2010) Evidences for balancing selection from PAH-*Bgl*III and PAH-*Eco*RI polymorphisms in Isfahan population. *Journal of Taxonomy and Biosystematics* 1(1): 73-80.
- Kelley, P., Harris, D. and Comer, B. (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics* 62: 792-799.
- Kikuchi, T., Kimura, R. and Paul, D. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and embryology* 191: 101-118.
- Lancaster, A., Nelson, M. P., Single, R. M., Meyer, D. and Thomson, G. (2003) PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pacific Symposium on Biocomputing* 8: 514-525.
- Man, Y. K., Trollove, C. and Tattersall, D. (2007) A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro. *Journal of Membrane Biology* 218: 29-37.
- Martinez, A., Acuna, R. and Figueroa, V. (2009) Gap-junction channels dysfunction in deafness and

- hearing loss. *Antioxidant and Redox Signaling* 11: 309-322.
- Meyer, C. G., Amedofu, G. K., Brandner, J. M., Pohland, D., Timmann, C. and Horstmann, R. D. (2002) Selection for deafness?. *Nature Medicine* 8: 1332-1333.
- Pier, G. B., Grout, M. and Zaidi, T. (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393: 79-82.
- Tran, V. N., Hieu, G., Clair, C., Bruzzone, R. (2003) Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nature Cell Biology* 5: 720-726.
- Rezaei, H. and Vallian, S. (2011) BanI/D13S141/D13S175 Represents a novel informative haplotype at the *GJB2* gene region in the Iranian population. *Cellular and Molecular Neurobiology* 5: 749-754.
- Zelante, L., Gasparini, P. and Estivill, X. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of nonsyndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics* 6: 1605-1609.

## Conservation of polymorphism in *GJB2* gene markers in Iranian population by balancing selection

Halimeh Rezaei <sup>1</sup>, Zahra Fazeli Attar <sup>1,2</sup>, Marjan Mojtabavi Naeini <sup>1</sup>  
and Sadeq Vallian Boroujeni <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

*GJB2* gene encodes connexin 26 which is an important skin-expressed gap junction protein. Connexin 26 is a transmembrane protein that is involved in the potassium ion recycling pathway in the inner ear. In this study, the neutrality tests were performed on genotyping data obtained from three polymorphic markers SNP1245, D13S141 and D13S175, located within the *GJB2* region. The population genetics analysis packages, PyPop and Popgene32, were used for the analysis of the data obtained from Iranian population. Fnd value of three markers, SNP1245, D13S141 and D13S175, in Iranian population was estimated -0.5980, -1.0155 and -0.6457, respectively but without significant P values. The results indicated the influence of balancing selection on polymorphic markers at *GJB2* gene. In the studied population, the F value of three markers lied inside L95 and U95 region of expected F value which showed no effect of genetic hitchhiking on markers located within *GJB2* region. The results obtained from this study indicated that the polymorphism of these three markers in *GJB2* gene was maintained by higher adaptive value of heterozygotes in Iranian population.

**Key words:** Neutrality test, Balancing selection, Iranian population, *GJB2* gene

---

\* svallian@biol.ui.ac.ir